

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
6 juin 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/43865 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **B01L 3/00**

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03743

(22) Date de dépôt international :
27 novembre 2001 (27.11.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/15417 29 novembre 2000 (29.11.2000) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE** [FR/FR];

31/33, rue de la Fédération, F-75752 PARIS 15^{ème}
(FR). **BIOMÉRIEUX SA** [FR/FR]; Chemin de l'Orme,
F-69280 MARCY L'ETOILE (FR).

(72) Inventeurs; et

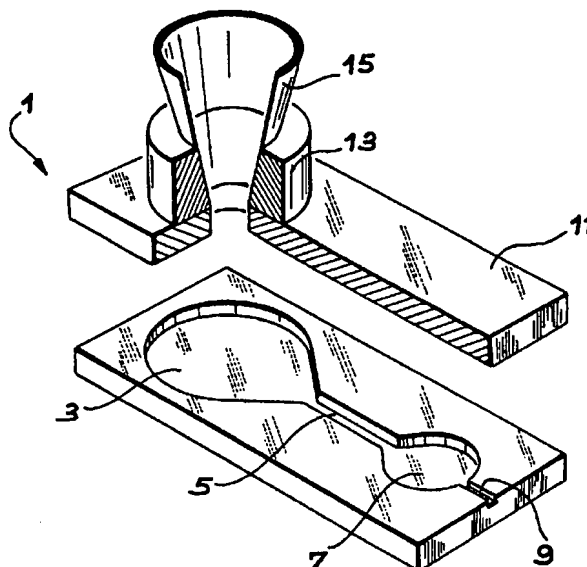
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **PUGET,
Pierre** [FR/FR]; 54 chemin du bois, F-38330 SAINT
ISMIER (FR). **POUTEAU, Patrick** [FR/FR]; 220 al-
lée Jean-François Thorand, F-38340 VOREPPE (FR).
GINOT, Frédéric [FR/FR]; 55 rue du Maréchal Leclerc,
F-38340 VOREPPE (FR). **CAILLAT, Patrice** [FR/FR];
10 rue de Provence, F-38130 ECHIROLLES (FR).

(74) Mandataire : **DES TERMES, Monique**; c/o BRE-
VATOME, 3 rue du Docteur Lancereaux, F-75008 PARIS
(FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHODS AND DEVICES FOR TRANSPORTING AND CONCENTRATING AN ANALYTE PRESENT IN A
SAMPLE

(54) Titre : PROCÉDES ET DISPOSITIFS DE TRANSPORT ET DE CONCENTRATION D'UN ANALYTE PRESENT DANS
UN ECHANTILLON



(57) Abstract: The invention concerns a method for transporting an analyte present in a sample, a method for concentrating an analyte present in a sample, and a device for implementing said methods. The method for transporting an analyte present in a sample consists in preparing a solution A from the sample wherein the analyte is fixed on magnetic particles; introducing solution A in a first container connected via a bottle-neck to a second container; displacing with a magnetic system the analyte fixed on magnetic particles from the first container to the second container via the bottle-neck; the second container being filled with all or part of solution A and/or with another solution.

[Suite sur la page suivante]

WO 02/43865 A1



(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) **Abrége :** La présente invention se rapporte à un procédé de transport d'un analyte présent dans un échantillon, à un procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon, et à un dispositif pour la mise en oeuvre de ces procédés. Dans le procédé de transport d'un analyte présent dans un échantillon de la présente invention, on prépare à partir de l'échantillon une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques ; on introduit la solution A dans un premier contenant relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant ; et on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement ; le deuxième contenant étant rempli par tout ou partie de la solution A et/ou par une autre solution.

PROCEDES ET DISPOSITIFS DE TRANSPORT ET DE
CONCENTRATION D'UN ANALYTE PRESENT DANS UN ECHANTILLON

DESCRIPTION

5 Domaine technique

La présente invention se rapporte à un procédé de transport d'un analyte présent dans un échantillon, à un procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon, et à un dispositif pour la mise en
10 œuvre de ces procédés.

Elle s'inscrit dans tous les domaines dans lesquels il existe un besoin de transporter un analyte d'une première solution à une deuxième solution, ceci par exemple pour des raisons d'incompatibilité de la
15 solution constituée par l'échantillon, ou d'éléments présents dans cette solution, avec un réactif ou un procédé chimique ciblant l'analyte.

Elle s'inscrit également dans tous les domaines dans lesquels il existe un besoin de concentrer un
20 analyte pour pouvoir le mettre en évidence par exemple en le faisant réagir avec un réactif par exemple de transformation et/ou de mise en évidence de l'analyte.

Par exemple, de nombreux tests de diagnostic in vitro consistent à faire réagir chimiquement un analyte
25 recherché avec un réactif adéquat. Le ou un des produits de la réaction est ensuite détecté directement ou indirectement.

On peut citer par exemple les tests immunologiques dans lesquels la réaction chimique est une
30 reconnaissance anticorps/antigène, ou de façon plus générale une réaction protéine/ligand, et les tests par

sondes d'acide(s) nucléique(s) dans lesquels on détecte une hybridation entre acides nucléiques.

Un test de diagnostic est d'autant meilleur qu'il présente à la fois une sensibilité et une spécificité élevées. Il est d'autant plus sensible qu'il permet de détecter une quantité faible d'analyte recherché. Il est d'autant plus spécifique qu'il n'est positif que pour l'analyte recherché et non pour des analytes semblables..

On entend par analyte tout ou partie de corpuscule ou molécule que l'on désire isoler, changer de milieu et/ou concentrer pour être utilisé et/ou mis en évidence tel qu'un microorganisme, une bactérie, un champignon, un virus, une cellule eucaryote ; un composé chimique ; une molécule telle qu'un peptide, une protéine, un enzyme, un polysaccharide, un lipide, une lipoprotéine, un lipopolysaccharide, un acide nucléique, une hormone, un antigène, un anticorps, un facteur de croissance, un haptène ; une cellule telle qu'une cellule tumorale etc.

Etat de la technique

De nombreux tests de diagnostic sont réalisés après des étapes d'extraction des analytes cibles des échantillons biologiques, de purification pour éliminer des produits parasites qui pénalisent les performances du test, de concentration des analytes cibles pour augmenter la quantité d'analyte par unité de volume de tampon, et de mise en solution des analytes cibles dans un tampon pour les rendre accessibles chimiquement.

En outre, pour augmenter la sensibilité et la spécificité d'un test permettant de mettre en évidence

un analyte, il est parfois nécessaire de réduire le volume du tampon dans lequel se trouve les exemplaires de l'analyte recherché, tout en conservant l'intégralité de ce dernier.

5 Les biologistes ont des moyens tout à fait classiques de concentration d'un analyte utilisant notamment des techniques de centrifugation, de filtration et/ou de sédimentation magnétique. Ces techniques nécessitent des transferts de solutions et
10 des manipulations de l'analyte qui conduisent à une réduction inévitable de la quantité d'analyte analysable.

Par exemple dans les procédés de centrifugation et de sédimentation magnétique, les étapes de
15 centrifugation ou de sédimentation magnétique proprement dites peuvent devoir être répétées plusieurs fois, la limite du nombre de répétitions étant imposée par le volume minimal de solution qui peut être manipulé facilement et de façon fiable avec une pipette
20 classique. Ce volume minimal est de l'ordre de la dizaine de micro-litre. En-deçà, on perd du liquide et donc de l'analyte en le transportant dans des "gros" contenants tels que des cônes de pipettes, des flacons, etc. En outre, il se pose des problèmes d'évaporation
25 et d'adsorption sur les parois des contenants lors de ces manipulations.

Dans le cas d'une concentration faible d'analyte dans l'échantillon au départ, ceci peut provoquer la disparition totale de l'analyte ou une diminution de sa
30 quantité telle qu'il peut devenir indétectable.

Outre les inconvénients précités, ces manipulations sont coûteuses en matériel et prennent beaucoup de temps.

Ceci reste un problème constant pour de nombreuses applications industrielles, par exemple la détection de microorganismes pathogènes dans un prélèvement biologique ou un échantillon industriel.

Il existe donc un réel besoin d'un procédé et d'un dispositif permettant de faire passer un analyte d'une première solution à une deuxième solution et/ou de concentrer un analyte tout en conservant la quantité d'analyte présente au départ, ceci par exemple afin d'accroître la sensibilité et la spécificité des tests de diagnostic et de toute réaction chimique dirigée vers l'analyte, et de pallier les inconvénients précités.

La présente invention répond à ce besoin, et présente non seulement l'avantage de pallier aux inconvénients précités, mais aussi de nombreux autres avantages que l'homme du métier ne manquera pas de relever.

Exposé de l'invention

La présente invention fournit un procédé de transport d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

- on prépare à partir de l'échantillon une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques,
- on introduit la solution A dans un premier contenant relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant, et

- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement,

5 le deuxième contenant étant rempli par tout ou partie de la solution A et/ou par une autre solution.

Il est à noter qu'il est également possible que la préparation de l'échantillon dans laquelle l'analyte est fixé sur les particules magnétiques peut être
10 réalisée directement dans le premier contenant. Ceci est également valable pour les procédés de concentration exposés ci-dessous.

Par transport de l'analyte au sens de la présente invention, on entend déplacement de l'analyte d'un
15 contenant à un autre contenant, avec ou sans le milieu liquide dans lequel l'analyte est présent. L'utilité d'un tel transport obtenu grâce au procédé et au dispositif de la présente invention, ainsi que les applications et avantages qui en découlent apparaîtront
20 clairement à l'homme du métier à la lecture de la présente description.

La présente invention fournit également un procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

25 - on prépare à partir de l'échantillon une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques,

- on introduit la solution A dans un premier contenant de volume α relié via un goulet
30 d'étranglement à un deuxième contenant de volume β , le volume β étant plus petit que le volume α , et

- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement,

- 5 le deuxième contenant étant rempli par la solution A et/ou par une autre solution.

Les analytes sont définis ci-dessus.

La préparation de la solution A à partir de l'échantillon comprend une étape dans laquelle
10 l'analyte est fixé de préférence de façon réversible sur des particules magnétiques. L'utilité de cette réversibilité est expliquée ci-dessous.

Les particules magnétiques ont une taille adéquate notamment avec l'analyte à isoler, et avec le volume de
15 solution A. Elles peuvent être de taille sub-micrométrique par exemple lorsque l'analyte est une molécule.

La quantité de particules utilisée est fonction notamment de la nature et de la quantité d'analyte à
20 fixer, elle est de préférence en nombre suffisant pour fixer la totalité de l'analyte. Les particules magnétiques utilisables dans le procédé de la présente invention peuvent être par exemple des produits tels que ceux de la marque de commerce Dynabeads de la
25 société Dynal (Norvège) ou MACS de la société Miltenyi Biotec (Allemagne), ou encore des produits de la société Immunicon Corp. (USA).

D'une manière générale, les particules magnétiques utilisables sont classiquement utilisées en biologie
30 moléculaire et cellulaire. Elles doivent être en particulier superparamagnétiques afin de rediffuser spontanément après annulation du champ magnétique.

Des exemples de protocoles de fixation ou de capture de l'analyte sur les particules magnétiques peuvent être trouvés par exemple dans les références *Bioscience Product Catalogue 2000*, et *Miltenyi Biotec, Tri Magnétique de Cellules, Séparation de biomolécules* 5 1999. Les principales particules disponibles sont les particules de Dynal, Seradyn, BioMag, Spherotec ou Estapor (marques déposées). De telles particules peuvent être revêtues d'oligonucléotides de capture, 10 par adsorption ou covalence. Les documents US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338 décrivent des procédés utilisables pour la présente invention. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de 15 brevet déposées par l'un des demandeurs sous les références suivantes :

- PCT/FR 97/00912 sous priorité française du 24 mai 1996, et

- PCT/FR 99/00011 sous priorité française du 20 6 janvier 1998.

Dans la dernière de ces demandes de brevet, il s'agit de particules magnétiques thermosensibles ayant chacune un noyau magnétique recouvert d'une couche intermédiaire. La couche intermédiaire est elle-même 25 recouverte par une couche externe à base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, le polymère externe est thermosensible et présente une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 10 et 30 100°C et de préférence entre 20 et 60°C. Cette couche externe est synthétisée à partir de monomères cationiques, qui génèrent un polymère ayant la capacité

de lier les acides nucléiques. Cette couche intermédiaire isole les charges magnétiques du noyau, afin d'éviter les problèmes d'inhibition des techniques d'amplification de ces acides nucléiques.

5 Selon l'invention, l'analyte fixé réversiblement sur les particules magnétiques peut être libéré desdites particules dans le deuxième contenant. En effet, il peut être nécessaire de libérer l'analyte pour qu'il puisse accéder plus facilement, ou être plus
10 facilement accessible, à des réactifs chimiques et/ou aux moyens utilisés pour le mettre en évidence.

 Selon l'invention, les particules magnétiques libérées de l'analyte peuvent être déplacées hors du deuxième contenant au moyen d'un système magnétique.
15 Ceci peut être utile par exemple pour éviter toute interaction préjudiciable des particules avec les analytes libérés et/ou avec des réactifs chimiques et/ou des moyens utilisés pour le mettre en évidence.

 Selon l'invention, la libération de l'analyte
20 recherché, ou élution de l'analyte, peut être effectuée par exemple dans une solution tampon par exemple par chauffage ou un autre procédé adéquat. Les procédés de libération utilisables sont tous les procédés classiques de l'état de l'art. Les techniques
25 chromatographiques offrent toute une panoplie de techniques de libération de protéines ou autre ligand utilisables dans le procédé de la présente invention, telles qu'un changement de pH ou un changement de force ionique, ou un changement de solvant, ou encore le
30 passage en tampon contenant de l'EDTA ou toute autre substance chélatante des cations métalliques si l'analyte est fixé à la particule par une technique de

métal-chélate. Si l'analyte est un oligonucléotide, on peut par exemple chauffer à une température de 50 à 60°C pour un oligonucléotide de longueur de 15 à 25 bases pour dissocier tous les analytes des particules
5 magnétiques.

Selon l'invention, le système magnétique est un système permettant de créer un champ magnétique fixe ou variable engendrant l'application d'une force sur les billes magnétiques, capable de les immobiliser ou de
10 les déplacer. Il peut être constitué d'un ensemble d'aimants ou de bobines.

Il peut s'agir également d'une bobine intégrée, réalisée par exemple par des procédés de micro-technologie tel qu'un dépôt de matériaux et de résines
15 photosensibles de masquage, une insolation de ces résines, des gravures de motifs à l'échelle du micron, par exemple. Des bobines de ce type sont par exemple fabriquées collectivement au moyen des technologies précitées pour réaliser des têtes de lecture/écriture
20 de disques durs.

Selon l'invention, après avoir été transportées, les particules magnétiques peuvent être remises en suspension, par exemple dans le deuxième contenant, par annulation du champ magnétique créé par le système
25 magnétique.

Selon une variante de la présente invention, les inventeurs fournissent également un procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

30 - on prépare à partir de l'échantillon une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques,

- on introduit la solution A dans un premier contenant de volume α relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant de volume β , le volume β étant plus petit que le volume α ,

5 - on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant jusqu'au goulet d'étranglement,

 - on libère l'analyte fixé sur les particules magnétiques desdites particules au niveau du goulet
10 d'étranglement,

 - on transporte par déplacement d'un liquide l'analyte du goulet d'étranglement vers le deuxième contenant.

 Selon une variante du procédé de concentration de
15 la présente invention, l'analyte peut être libéré dans le deuxième contenant, et l'analyte peut être déplacé soit sous transport du liquide contenant les analytes, soit avec transport par déplacement d'un liquide du second contenant vers un troisième contenant.

20 Selon l'invention, on peut déplacer les particules magnétiques libérées de l'analyte du deuxième contenant au premier contenant via le goulet d'étranglement, ou du goulet d'étranglement audit premier contenant, au moyen d'un système magnétique.

25 Selon l'invention, comme décrit ci-dessus, l'analyte peut être libéré des particules magnétiques par modification des conditions physiques ou chimiques par exemple par chauffage ou par réaction avec au moins une substance présente dans l'autre solution.

30 Selon l'invention, un agent d'immobilisation de l'analyte peut être fixé sur tout ou partie d'au moins une paroi du deuxième contenant ou de tout support

solide présent dans ledit deuxième contenant. De tels supports peuvent par exemple être constitués par des billes de silice, des billes de verre pleines, creuses ou poreuses, des particules de quartz, des grains de sable, des grains de vermiculite, zéolite et/ou feldspath, de la laine de verre et/ou de roche, des billes d'argile, des particules de liège, des billes de polystyrène, de polyéthylène, de polypropylène, de polyéthylène de petite taille agglomérées, de porosité et d'épaisseur variables, de billes de latex, de billes revêtues de gélatine, et de grains de résine.

Selon l'invention, le goulet d'étranglement peut être sous la forme d'un capillaire. Cette forme peut être intéressante par exemple pour limiter la diffusion de l'analyte du deuxième contenant vers le premier contenant lorsque ledit analyte a été libéré des particules magnétiques.

La présente invention fournit également un procédé de mise en évidence d'un analyte dans un échantillon dans lequel :

- on procède à une concentration de l'analyte au moyen d'un procédé de concentration de la présente invention,
- on met en évidence l'analyte dans le deuxième contenant ou dans tout autre contenant relié directement ou indirectement au deuxième contenant.

Le deuxième contenant ou chambre de réaction ou tout autre contenant relié directement ou indirectement au deuxième contenant peut contenir un ou des réactif(s) secs ou en solution destiné(s) à réagir directement ou indirectement avec l'analyte. Par

indirectement on entend que plusieurs réactions chimiques successives peuvent être réalisées sur l'analyte ou un de ses dérivés obtenu. Des particules magnétiques sous forme de pastilles sont décrites dans l'état de la technique, par exemple dans le document EP-A-0 811 694. La fabrication des pastilles est également bien décrite dans l'état de la technique, par exemple dans les documents US-A-4,678,812 et US-A-5,275,016. Cette fabrication évoquée ci-dessus peut être utilisée pour la synthèse des autres pastilles qui seront exposées par la suite, telles que :

- une pastille qui comporte des constituants structurels, comme des dNTP, des amorces ou des ions, permettant l'amplification ultérieure telle que décrite dans le brevet US-A-5,098,893 ou l'article "Ambiant-temperature-stable molecular biology reagents" R. Ramanujam et al., Product Application Focus, vol. 14, n°3 (1993), 470-473, par exemple,

- une pastille contenant des constituants fonctionnels, tels que des enzymes qui, associés avec les constituants structurels précédemment cités, permettent la conduite d'une amplification. Des exemples de telles pastilles sont donnés dans le brevet US-A-4 891 319, les demandes de brevet WO-A-87/00196 et WO-A-95/33488 ou l'article "Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose : simplified molecular biology", de C. Colaço et al., Bio/Technology, vol. 10, September 1992, 1007-1011.

On peut par exemple prévoir, selon la présente invention, des plots d'hybridation fixés sur une surface du deuxième contenant de manière à ce qu'ils

soient accessibles à l'analyte lorsqu'il se trouve dans le deuxième contenant. Ceci peut être réalisé par exemple sous la forme d'une puce à ADN intégrée. Ainsi, selon la présente invention, lorsque l'analyte à mettre
5 en évidence est un acide nucléique, il peut être mis en évidence par une technologie de puce à acide nucléique.

Selon la présente invention, le deuxième contenant peut donc être un réservoir d'un microcomposant, par exemple d'une biopuce, par exemple d'une puce à ADN.
10 Par biopuce, on entend tout support solide sur lequel sont fixés des ligands, et en particulier par une puce à ADN, on entend tout support solide sur lequel sont fixés des acides nucléiques. La méthode de fixation des ligands peut être réalisée de différentes manières et
15 notamment par adsorption ou covalence comme par exemple la synthèse in situ par les techniques de photolithographie ou par un système piézo-électrique, par dépôt capillaire de ligands préformés. A titre d'illustration, des exemples de ces biopuces appliqués
20 aux puces à ADN sont donnés dans les publications de G. Ramsay, Nature Biotechnology, 16, p. 40-44, 1998 ; F. Ginot, Human Mutation, 10, p. 1-10, 1997 ; J. Cheng et al., Molecular diagnosis, 1(3), p. 183-200, 1996 ; T. Livache et al., Nucleic Acids Research, 22(15),
25 p. 2915-2921, 1994 ; J. Cheng et al., Nature Biotechnology, 16, p. 541-546, 1998 ou dans les brevets US 4,981,783 (Augenlicht), US 5,700,637 (Southern), US 5,445,934 (Fodor), US 5,744,305 (Fodor), US 5,807,522 (Brown).

30 Selon l'invention, le deuxième contenant peut être aussi une chambre d'entrée vers un autre contenant d'un autre procédé. Ainsi, le deuxième contenant peut être

relié directement ou indirectement à un autre contenant utilisé pour d'autres réactions chimiques ou étapes de procédé ciblant l'analyte ou un de ses dérivés telle qu'une purification, une amplification, un marquage, etc. Par exemple, l'autre contenant ou chambre peut être une chambre de PCR pour amplifier un gène, éventuellement avec ensuite une analyse dans un laboratoire sur puce ("micro-total analysis system" : MicroTas).

Néanmoins, toutes les techniques d'amplification peuvent être utilisées. Ainsi, pour l'amplification des acides nucléiques, il existe entre autres les techniques suivantes :

- PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4 683 195, US-A-4 683 202 et US-A-4 800 159,

- LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0 201 184,

- RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069,

- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,

- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818,

- SPSR (Single Primer Sequence Replication) avec le brevet US-A-5 194 370, et

- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5 399 491.

Selon l'invention, d'autres réactifs peuvent être utilisés, tels que des réactifs lyophilisés, par exemple pour faire un test homogène de détection de l'analyte, par exemple par transfert de fluorescence.

Selon l'invention, de manière non limitative, l'analyte est défini ci-dessus.

La présente invention fournit également un
5 dispositif de transport d'un analyte fixé sur des
particules magnétiques présent dans un liquide, ledit
dispositif comprenant :

- un premier contenant destiné à contenir un
liquide et relié via un goulet d'étranglement à un
10 deuxième contenant,

- un système magnétique permettant de déplacer
les particules magnétiques sur lesquelles est fixé
l'analyte du premier contenant au deuxième contenant
via le goulet d'étranglement.

15 Selon l'invention, les volumes des premier et
deuxième contenants sont de préférence adaptés aux
volumes de solutions à manipuler. Ces volumes peuvent
être inférieurs ou égaux à 10 ml.

20 La présente invention fournit également un
dispositif de concentration d'un analyte fixé sur des
particules magnétiques présent dans un liquide, ledit
dispositif comprenant :

- un premier contenant de volume α destiné à
25 contenir un liquide relié via un goulet d'étranglement
à un deuxième contenant,

- ledit deuxième contenant de volume β plus
petit que le volume α du premier contenant, et

- un système magnétique permettant de déplacer
30 les particules magnétiques sur lesquelles est fixé
l'analyte du premier contenant au deuxième contenant
via le goulet d'étranglement.

Certains éléments de ces dispositifs ont déjà été décrits pour le procédé de la présente invention, et devront être pris en considération avec la description ci-dessous.

5 Selon la présente invention, ces contenants sont utilisables par exemple comme chambres de réaction. Les techniques précitées permettent également de réaliser des capillaires de section de quelques microns-carrés à quelques centaines de milliers de microns-carrés pour
10 le transfert de solutions, ou d'un analyte fixé sur des microparticules, selon la présente invention, d'un premier contenant à un deuxième contenant, par exemple d'une chambre de réaction à une autre chambre de réaction.

15 Selon l'invention, le rapport des volumes α/β peut être par exemple de 10 à 1000.

 Selon l'invention, le premier contenant peut par exemple avoir un volume d'environ 0,1 à 100 μ l.

20 Selon l'invention, le deuxième contenant peut avoir un volume d'environ 0,01 à 1 μ l.

 L'invention permet donc une réduction de volume qui est de 100 à 1000 fois supérieure à ce qui pouvait être atteint par les pratiques de laboratoire ou de systèmes "macroscopiques" automatisés de l'art
25 antérieur manipulant des liquides avec des pipettes et des flacons de quelques dizaines de microlitres. Elle permet de ce fait de concentrer un échantillon par le même facteur 100 à 1000.

30 En effet des techniques de photolithogravure de substrats solides, par exemple de silicium, de silice, ou de verre, ou de moulage de grande précision de matières plastiques, permettent la réalisation de

contenants de dimensions submillimétriques, voire de l'ordre de quelques microns dans au moins une direction, qui peuvent donc avoir des volumes réduits à des fractions de micro-litre.

5 Selon l'invention, le premier contenant et/ou le deuxième contenant peuvent/peut avoir une forme qui converge vers ledit goulet d'étranglement. Le goulet d'étranglement peut être par exemple sous la forme d'un capillaire tel que décrit dans le paragraphe précédent.

10 Selon l'invention, le goulet d'étranglement peut par exemple avoir une section comprise entre $1 \mu\text{m}^2$ à 1 mm^2 , préférentiellement $100 \mu\text{m}^2$ à $0,1 \text{ mm}^2$.

 Selon l'invention, le deuxième contenant et/ou le goulet d'étranglement peut/peuvent être muni(s) de
15 canaux d'entrée/sortie de fluides. Ces canaux ont bien entendu une section adaptée en fonction des volumes de solution qu'ils sont destinés à contenir. Ainsi, par exemple pour une mise en évidence de l'analyte, lorsqu'il s'agit d'un acide nucléique, dans le deuxième
20 contenant par une hybridation sur des sondes de capture portées par un support solide, ces canaux peuvent être utilisés pour faire les lavages nécessaires avant l'étape de lecture.

 Selon l'invention, les dispositifs précités
25 peuvent comprendre un évent sous forme de capillaire présent au niveau du deuxième contenant et reliant directement celui-ci à l'extérieur. Lors des opérations de remplissage et/ou de transfert de fluide dans le deuxième contenant, cet évent sert à évacuer le fluide
30 initialement présent dans le contenant que ce soit de l'air ou du liquide. La présence d'air dans le deuxième contenant n'est qu'une éventualité. Il peut y avoir des

événements à d'autres endroits, par exemple au niveau du goulet d'étranglement, du premier contenant etc. Ces événements de mise à l'air libre peuvent être commandés par exemple par des vannes à billes.

5 L'invention permet donc grâce à l'utilisation de techniques de micro-technologies de s'intégrer dans les dispositifs appelés aujourd'hui labopuce, ou "lab-on-a-chip" ou bien encore "micro-Total-Analysis-System" (MicroTAS) dans la terminologie anglo-saxonne.

10 Dans l'exemple "lab-on-a-chip" le dispositif de la présente invention peut être combiné à d'autres fonctions pour former un système plus complet et plus précis d'analyse biologique.

Par exemple, le dispositif de la présente invention peut être le premier élément d'un ensemble comprenant :

1. un module de concentration/réduction de volume,
2. un module d'amplification,
- 20 3. un module de séparation, par exemple par électrophorèse,
4. un module de détection.

Un exemple de dispositif intégré comprenant les éléments 2, 3 et 4 ci-dessus est décrit dans la
25 référence M.A. Burns et al. , *An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device*, Science, vol 282, 16 oct 98.

Dans certaines réalisations de la présente invention, les concepts de chambre de réaction et de canaux de transfert peuvent donc se confondre puisque
30 ces labopuces permettent la réalisation de procédés en continu pour lesquels les réactions se font dans des

capillaires, par exemple dans certaines techniques d'électrophorèse capillaire et de PCR.

L'invention peut par exemple être utile quand l'analyte recherché est initialement présent dans un
5 échantillon de grand volume mais en quantité limitée.

L'invention proposée permet, par exemple par la mise en œuvre des micro-technologies précitées, de concentrer une solution de molécules que l'on veut détecter, ou de déplacer un analyte d'une première
10 solution vers une deuxième solution dans un volume inférieur au microlitre, complètement inaccessible par les procédés classiques de laboratoire.

La présente invention peut être mise en œuvre par exemple dans un système de diagnostic in vitro automatisé, ou un système de détection de contaminants
15 biologiques dans des domaines tels que l'agroalimentaire et/ou le contrôle microbiologique industriel.

L'invention peut être appliquée par exemple pour
20 la détection ultrasensible sans amplification de pathogènes dans un échantillon biologique. Les acides nucléiques des pathogènes potentiellement présents dans un échantillon peuvent être extraits par des techniques habituelles. Ils peuvent ensuite être purifiés et
25 concentrés, toujours par des techniques standards, jusqu'à un volume de tampon de quelques dizaines de microlitres.

L'utilisation du dispositif de la présente invention ou micro-composant permet dans ce cas de
30 concentrer le matériel biologique dans le volume de la chambre de réaction qui correspond au deuxième composant. Là, des étapes ultérieures d'hybridation sur

support plan et de détection permettent de détecter la présence ou non d'acides nucléiques de séquence donnée, caractéristique de l'infection de l'échantillon.

L'utilisation de l'invention permet donc
5 d'augmenter très fortement la sensibilité d'un test, à performances égales du système de détection.

La présente invention peut par exemple être appliquée pour améliorer les immuno-essais. En effet, pour les immuno-essais dans lesquels se pose un
10 problème de sensibilité, l'utilisation de l'invention, comme précédemment décrite, en concentrant le matériel biologique dans un volume très faible, permet d'augmenter fortement leur sensibilité.

Pour les immuno-essais où la quantité de matériel
15 biologique à détecter est suffisante, l'utilisation de l'invention permet de concentrer le prélèvement, et donc de diminuer la durée de la réaction immunologique.

D'autres caractéristiques et avantages apparaîtrons encore dans les exemples ci-dessous,
20 donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif, en référence aux figures annexées.

Brève description des figures

- La figure 1 est une représentation
25 schématique en perspective et éclatée avec une coupe partielle d'un premier mode de réalisation d'un dispositif selon la présente invention,

- La figure 2 est une représentation schématique en perspective et éclatée d'un deuxième
30 mode de réalisation d'un dispositif selon la présente invention,

- La figure 3 est une représentation schématique en perspective et éclatée avec une coupe partielle d'un troisième mode de réalisation d'un dispositif selon la présente invention,

5 - La figure 4 est une représentation schématique d'un premier aimant utilisable pour la mise en oeuvre de la présente invention, et

 - La figure 5 est une représentation schématique d'un deuxième aimant utilisable pour la
10 mise en oeuvre de la présente invention.

Sur ces figures, les références identiques indiquent des éléments identiques.

Exemples

15

Exemple 1 : exemple de préparation de la solution A

L'échantillon biologique est traité par des moyens classiques de biologie moléculaire pour obtenir une solution contenant les molécules d'ARN cible à
20 détecter ; cette solution a un volume de 200 microlitres et la solution tampon est la suivante : Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1M, triton X-100 0,05%, ADN de saumon 0,14 mg/ml.

On ajoute à cette solution 2 μ l d'une solution
25 d'oligonucléotides de capture ; cette solution d'oligonucléotides de capture est constituée de : Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8, oligonucléotide de capture $10^{11}/\mu$ l ; l'oligonucléotide de capture est un oligonucléotide, biotynilé en 5', d'une séquence par
30 exemple de 32 bases, complémentaire d'une sous-séquence de l'ADN cible.

Incubation pendant 2h à 35°C.

Introduction de 1 µl de particules Immunicon Corporation, streptavidine ferrofluide, non diluées.

Incubation 30 minutes à 35°C.

- 5 Dans ces conditions, plus de 95% des molécules cibles se trouvent immobilisées sur les particules magnétiques.

10 Exemple 2 : dispositif selon un premier mode de réalisation de la présente invention

Le dispositif ou composant décrit dans cet exemple est un micro-composant qui permet de réduire d'un facteur 100 à 1000 le volume de tampon dans lequel se trouve un analyte recherché, tout en conservant la
15 quantité d'analyte présente dans l'échantillon initial.

L'architecture générale du composant 1 est représentée à la figure 1. Il est constitué d'une chambre d'introduction 3, éventuellement prolongée par un dispositif d'introduction constitué des pièces 13 et
20 15, reliée à une chambre de réaction 7 par l'intermédiaire d'un goulet d'étranglement 5, ici représenté sous la forme d'un capillaire. Les formes particulières des deux chambres sont données à titre d'exemple. Les chambres et le capillaire peuvent être
25 de forme ou de taille différente suivant l'application ou la technologie de fabrication du composant. La figure 1 suggère un mode de fabrication selon lequel le composant est fabriqué en gravant les chambres et le goulet d'étranglement dans un matériau plan, puis en
30 assemblant par collage ou tout autre mode de fixation le couvercle 11. C'est un mode de fabrication possible,

mais l'invention n'est pas dépendante de ce mode de fabrication. Toute autre technologie, en particulier :

- permettant de creuser un matériau directement pour réaliser des cavités de la forme des chambres et du goulet d'étranglement,
 - ou qui consisterait à creuser les chambres 3 et 7 ainsi que le goulet d'étranglement dans la plaque supérieure, dans l'exemple dans le couvercle 11, au lieu de les creuser dans la plaque inférieure,
- pourrait être utilisée pour fabriquer le dispositif.

On peut citer par exemple les techniques à l'image de la "LIGA" utilisant la lithographie, la galvanoplastie et le moulage.

Un évent 9 permet l'évacuation des fluides air ou liquide lorsqu'on remplit ou transfère des liquides dans les chambres.

L'échantillon et les différents réactifs ou tampons peuvent être introduits dans les dispositifs de différentes manières. Nous en donnons deux ici à titre d'exemples.

Ce premier mode de réalisation, illustré sur la figure 1, est réalisé en pratiquant un orifice dans le couvercle 11 du dispositif et en équipant cet orifice d'une cuvette conique 15. Une pièce cylindrique 13 sert à maintenir la cuvette conique en position et à assurer l'étanchéité entre la cuvette conique et le dispositif. En appliquant par exemple une pipette, un embout de diluteur ou de seringue, sur la cuvette conique, on peut "pousser" le tampon ou un réactif à l'intérieur du dispositif en exerçant une pression sur le liquide. L'air ou tout autre fluide liquide ou gazeux initialement présent dans le dispositif sera évacué du

dispositif par l'évent 9. Cet événement débouche ici dans la chambre de réaction, mais il pourra être placé suivant les cas à d'autres endroits du dispositif. On pourra même éventuellement disposer de plusieurs
5 événements.

Un second mode de réalisation pour l'introduction de liquide dans le dispositif est représenté à la figure 2. Dans ce mode de réalisation 1(a), les liquides sont introduits par un capillaire 17, lui-même
10 connecté à l'extérieur du dispositif par une interface, non représentée sur la figure. Le couvercle 19 ne comprend pas d'orifice.

Exemple 3 : concentration avec transport sur particules
15 magnétiques

Le procédé décrit dans cet exemple permet de réduire d'un facteur 100 à 1000 le volume de tampon dans lequel se trouve un analyte recherché, tout en conservant la quantité d'analyte présente dans
20 l'échantillon initial. Il met en oeuvre le dispositif représenté dans l'exemple précédent.

Le composant est préalablement rempli de tampon sans analyte recherché et sans particule magnétique. Ce tampon peut être introduit en versant la quantité
25 nécessaire dans la cuvette conique 15 représentée sur la figure 1, et en appliquant une pression pneumatique dans cette cuvette conique. Une fois le composant rempli, le tampon en excès présent dans la cuvette conique 15 est retiré, par exemple à l'aide d'une
30 pipette.

L'échantillon composé d'une certaine quantité de tampon, par exemple de l'ordre de 30 μ l, dans lequel

les analytes recherchés ont été préalablement fixés sur des particules magnétiques est déposé dans la cuvette conique 15.

Les particules magnétiques sont ensuite attirées
5 vers le fond de la chambre d'introduction 3 (figure 1) à l'aide d'un aimant, par exemple l'aimant 30 de la forme indiquée à la figure 4 positionné sous le dispositif, à l'aplomb de la cuvette conique. Les particules magnétiques sont alors rassemblées en un
10 culot de petite taille.

A l'aide d'un autre aimant, par exemple l'aimant 40 de la forme indiquée à la figure 5, disposé de telle sorte que le dispositif se trouve dans son entrefer 42, le culot est attiré et transporté de sa position
15 initiale dans la première chambre d'introduction 3, à travers le capillaire 5, dans la chambre de réaction 7.

L'analyte est ensuite libéré des particules magnétiques par chauffage (élution) à l'intérieur de la chambre de réaction 7. Pendant cette opération, les
20 particules magnétiques sont éventuellement remises en suspension dans la chambre de réaction 7 en retirant l'aimant.

Les particules magnétiques sont de nouveau rassemblées en un culot dans la chambre de réaction 7
25 en utilisant à nouveau un aimant, par exemple de la forme présentée sur la figure 4. Elles sont ensuite transportées à nouveau à travers le capillaire 5, mais en sens inverse que précédemment, de la chambre de réaction 7 vers la chambre d'introduction 3, en
30 utilisant un aimant, par exemple de la forme présentée à la figure 5.

Le résultat final de cette suite d'opérations est le transport de la totalité des analytes de la cuvette conique 15 vers la chambre de réaction 7, de volume beaucoup plus faible.

5

Exemple 4 : concentration avec transport fluidique

Le procédé décrit dans cet exemple est une variante du précédent.

Comme précédemment, le composant est préalablement
10 rempli par du tampon sans particule magnétique. L'échantillon composé d'une certaine quantité de tampon, par exemple de l'ordre de 30 μ l, dans lequel les analytes recherchés ont été préalablement fixés sur des particules magnétiques est déposé dans la cuvette
15 conique 15. Les particules magnétiques sont attirées vers le fond de la chambre d'introduction 3 (figure 1) à l'aide d'un aimant, par exemple de la forme indiquée à la figure 4. Les particules magnétiques sont alors rassemblées en un culot de petite taille.

20 A l'aide d'un autre aimant, par exemple de la forme indiquée à la figure 5, disposé de telle sorte que le dispositif se trouve dans son entrefer, le culot est attiré et transporté de sa position initiale dans le capillaire 5 (et non plus dans la chambre de
25 réaction 7).

L'analyte est libéré des particules magnétiques par chauffage (élution) à l'intérieur du capillaire 5. Pendant cette opération, les particules magnétiques sont éventuellement remises en suspension dans le
30 capillaire en retirant l'aimant.

Les particules magnétiques sont à nouveau rassemblées en un culot dans le capillaire en utilisant

à nouveau un aimant, par exemple de la forme présentée à la figure 4. A ce moment, les analytes sont libres en solution à l'intérieur du capillaire. En poussant du tampon à l'intérieur du dispositif par une surpression
5 au niveau de la cuvette conique 15, on provoque un déplacement de liquide dans le capillaire vers la chambre de réaction 7. Les analytes en solution sont ainsi entraînés par le déplacement du liquide dans la chambre de réaction 7. Les particules magnétiques,
10 elles, restent en position dans le capillaire, maintenues en position sous forme de culot par l'aimant fixe.

Le résultat final de cette suite d'opérations est comme précédemment le transport de la totalité des
15 analytes de la cuvette conique 15 vers la chambre de réaction 7, de volume beaucoup plus faible.

Selon une variante de ce procédé, les particules magnétiques sont sous la forme d'entités sèches déjà présentes dans la chambre d'introduction 3. De telles
20 entités sont bien décrites dans les brevets US-A-5,750,338 et 4,672,040. L'introduction de l'échantillon, dans ladite chambre 3, solubilise les particules magnétiques qui se fixent alors à l'analyte présent dès le départ dans ledit échantillon.

25

Exemple 5 : utilisation de l'invention pour mettre en évidence l'analyte dans un test de détection homogène

Dans cet exemple, l'analyte est mis en évidence en utilisant la technique des "Molecular Beacons", telle
30 qu'elle est décrit dans Tyagi, S. and Kramer, F.R., Nat. Biotechnol. 14:30-308, 1996.

Brièvement, cette technique consiste à mettre les molécules cibles avec des sondes nucléiques, les "Molecular Beacons", qui ont la structure suivante : la séquence sonde, complémentaire de la cible, est
5 prolongée de part et d'autre par deux bras de quelques nucléotides de long, complémentaires l'un de l'autre. Un fluorophore, par exemple le groupe EDANS, est fixé à l'un des bras, alors qu'un inhibiteur de fluorescence, par exemple le groupe DABCYL est fixé à l'autre bras.
10 En l'absence de cible, les deux bras de la sonde s'hybrident l'un sur l'autre et la fluorescence de EDANS est éteinte par le DABCYL. Quand la sonde s'hybride sur la cible, les deux groupes se trouvent éloignés l'un de l'autre, et la fluorescence de EDANS
15 est libérée. Ainsi, la présence et même la concentration de l'analyte, est révélée par le signal de fluorescence et l'intensité de ce signal.

La mise en oeuvre de cette technique dans un dispositif conforme à l'invention est par exemple la suivante :

- 20 1. Préparation de la solution A à analyser, l'analyte étant un acide nucléique,
2. Remplissage du deuxième contenant 7 du dispositif, ainsi que du goulet d'étranglement 5 et du fond 3 du premier contenant par une
25 solution de révélation, contenant les sondes nucléiques précédemment définies nécessaires à la détection de l'analyte.
3. Introduction de la solution A dans le premier contenant 3 prolongé par le cône 15,
- 30 4. Concentration magnétique des particules magnétiques dans le fond du premier contenant 3, puis transport magnétique des particules

magnétiques dans le deuxième contenant 7, par exemple selon les modalités décrites dans l'exemple 3,

5 5. Chauffage à 60°C de l'ensemble du dispositif, attente de 1 à 2 minutes à cette température. L'analyte est alors libéré des particules,

6. Transport magnétique des particules magnétiques du deuxième contenant 7 vers le premier contenant,

10 7. Mise à la température adéquate pour l'hybridation de la sonde nucléique beacon, par exemple 25°C,

8. Lecture de la fluorescence dans le deuxième contenant 7 par exemple en plaçant le
15 dispositif sous un microscope à épi-fluorescence équipé d'un photomultiplicateur.

L'avantage de cette procédure par rapport à l'état de l'art est de concentrer dans un rapport alpha/béta
20 l'analyte, par exemple de 100 fois, et donc de diminuer relativement la fluorescence résiduelle des sondes "Molecular Beacons", et ainsi augmenter d'autant le rapport signal sur bruit intrinsèque à cette technique de mise en évidence d'un analyte. La sensibilité du
25 test est donc augmentée d'autant.

Exemple 6 : utilisation de l'invention pour mettre en évidence l'analyte à l'aide d'une puce à ADN

Dans cet exemple, l'analyte est mis en évidence
30 par hybridation sur une puce à ADN ; la puce à ADN a l'avantage, par rapport à la technique de marquage présentée à l'exemple 5, de pouvoir faire beaucoup

d'hybridations en parallèle, donc d'offrir au biologiste une puissance analytique bien plus grande.

Dans cet exemple, le fond du deuxième contenant 7 est une puce à ADN, constituée par exemple d'une
5 vingtaine de plots d'hybridation. La puce est fabriquée par dépôt d'ADN selon les moyens standards de l'état de l'art des puces à ADN.

La mise en oeuvre de cette technique dans un dispositif conforme à l'invention peut être par exemple
10 la suivante :

1. Préparation de la solution A à analyser, l'analyte étant un acide nucléique, marqué par un groupement fluorescent, par exemple de la fluorescéine, par des moyens classiques de
15 l'état de l'art,
2. Remplissage du deuxième contenant 7 du dispositif, ainsi que du goulet d'étranglement 5 et du fond 3 du premier contenant par le tampon d'hybridation, par exemple : Tris
20 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 1M, triton X-100 0,05%, ADN de saumon 0,14 mg/ml,
3. Introduction de la solution A dans le premier contenant 15,
4. Concentration magnétique des particules
25 magnétiques dans le fond 3 du premier contenant, puis transport magnétique des particules magnétiques dans le deuxième contenant 7, par exemple selon les modalités décrites dans l'exemple 3,
- 30 5. Chauffage à 60°C de l'ensemble du dispositif. L'analyte est alors libéré des particules,

6. Transport magnétique des particules magnétiques du deuxième contenant 7 vers le premier contenant 3,
- 5 7. Hybridation dans les conditions de température et de durée adéquates pour la puce à ADN considérée. Par exemple, hybridation pendant 30 minutes à 40°C,
8. Lavage par passage dans le deuxième contenant 7, au moyen de l'entrée et de la sortie de fluide par les ouvertures 21, 22 représenté
10 sur la figure 3, d'une solution de lavage, par exemple Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1M, triton X-100 0,5%,
9. Lecture de la fluorescence présente sur la
15 puce à ADN, par exemple en mettant le dispositif sous un microscope à épi-fluorescence équipé d'une caméra CCD, et en utilisant un grossissement adéquat.

Comme dans l'exemple précédent, la concentration
20 de l'analyte avant son hybridation sur la puce à ADN permet une réaction plus rapide de l'analyte sur la puce à ADN. Cette accélération de la cinétique par rapport à l'état de l'art permet, soit de diminuer le temps d'hybridation, soit d'augmenter la sensibilité de
25 détection du système, puisque cette sensibilité est en général limitée par la cinétique d'hybridation de l'analyte sur la puce à ADN.

30 Exemple 7 : utilisation de l'invention comme point d'entrée d'un μ TAS

Dans cet exemple, l'invention sert de point d'entrée à un μ TAS plus complexe qu'un dispositif

composé seulement de deux contenants séparés par un
goulet d'étranglement. Nous prenons comme exemple de
 μ TAS celui présenté par l'équipe de A. Northrup, qui
consiste en une chambre d'amplification, suivie d'une
5 électrophorèse capillaire des produits amplifiés et
d'une détection (voir Anal. Chem. 1996, 68, 4081-4086).

Dans cet exemple, le deuxième contenant est en
fait une chambre d'amplification par PCR, par exemple
fabriquée par les moyens des microtechnologies. Ceci
10 signifie que le deuxième contenant est muni d'un moyen
de chauffage, d'un moyen de refroidissement, et d'un
capteur de température, ce qui permet d'appliquer à
l'échantillon liquide contenu dans le deuxième
contenant 7 des cycles thermiques. L'entrée-sortie 21,
15 22 de fluide coupant ce deuxième contenant est le canal
d'injection par électrophorèse de l'échantillon
amplifié dans le capillaire de séparation. Le
capillaire de séparation n'est pas montré sur nos
figures (voir figure 1 de l'article sus-cité), ni les
20 microréservoirs permettant l'application des champs
électriques nécessaires à l'injection puis à la
séparation par électrophorèse.

Le deuxième contenant contient en outre des culots
secs contenant tous les produits nécessaires à
25 l'amplification par PCR ; ces produits sont
"glassifiés" par des techniques bien connues, et les
culots glassifiés, en forme de bille, contenant les
divers produits nécessaires à l'amplification, sont
déposés dans le deuxième contenant avant mise en place
30 du couvercle. La fabrication de ces culots est bien
décrite dans l'état de la technique, par exemple
US-A-4,678,812 et US-A-5,275,016.

Le capillaire de séparation contient en outre un gel de séparation, par exemple de l'hydroxy éthyl cellulose, qui lui-même contient un marqueur fluorescent de l'ADN, par exemple le thiazole orange.

5 Ainsi, les fragments d'ADN seront marqués par le thiazole orange au cours de leur migration électrophorétique dans le capillaire de séparation.

L'utilisation d'un tel dispositif est par exemple la suivante :

- 10 1. Préparation de la solution A à analyser, l'analyte étant un acide nucléique,
2. Remplissage de l'ensemble du dispositif, notamment des capillaires, par la solution d'électrophorèse ; les culots de réactifs
15 présents dans le deuxième contenant commencent à s'hydrater,
3. Introduction de la solution A dans le premier contenant 15,
4. Concentration magnétique des particules
20 magnétiques dans le fond du premier contenant 3, puis transport magnétique dans le deuxième contenant 7, selon les modalités de l'exemple 3 ci-dessus,
5. Chauffage à 60°C du deuxième contenant 7.
25 Attente de 10 à 30 minutes selon le culot de réactif à dissoudre. En effet, ce chauffage a principalement pour but d'accélérer la remise en solution des culots de réactifs présents dans le contenant,
- 30 6. Cyclage thermique pour effectuer l'opération d'amplification des cibles (il existe des particules magnétiques qui ne gênent pas

- l'amplification, il n'est donc pas nécessaire de les retirer de la chambre d'amplification),
7. Injection par électrophorèse de l'échantillon amplifié dans le capillaire de sortie,
- 5 8. Electrophorèse capillaire dans le capillaire de séparation, par exemple, selon les modalités décrites dans l'article suscitée,
9. Détection des fragments amplifiés par exemple par un microscope à épi-fluorescence équipé
- 10 d'un photomultiplicateur, le champ du microscope étant situé en fin du capillaire de séparation.

Dans cet exemple, le couplage de l'invention à un système intégré d'amplification et d'électrophorèse capillaire permet :

15

- de concentrer l'échantillon avant amplification, par exemple de 100 fois, donc de diminuer le nombre de cycles d'amplification nécessaires (moins 8 cycles environ), ce qui limite les risques
- 20 intrinsèques à l'amplification (biais d'amplification selon les séquences, risque de contamination croisée, ...),
- de diminuer le volume de l'échantillon pour l'amplification, donc de diminuer les quantités de
- 25 réactifs nécessaires à l'amplification d'où un gain de coût sur les réactifs,
- d'augmenter le nombre d'échantillons qu'il est possible de traiter en parallèle dans un même
- 30 dispositif grâce à la diminution des dimensions de la chambre d'amplification.

Par ailleurs, la rapidité avec laquelle s'effectue l'ensemble de la chaîne, de l'ordre de quelques minutes

pour le transport magnétique, de 10 à 15 minutes pour l'amplification et de 1 à 2 minutes pour l'électrophorèse capillaire, permet d'obtenir des résultats d'excellente qualité, sans qu'il soit

5 nécessaire d'isoler les compartiments par des vannes.

REVENDICATIONS

1. Procédé de transport d'un analyte présent dans une solution A dans lequel on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur des particules magnétiques d'un premier contenant à un deuxième contenant via un goulet d'étranglement, le deuxième contenant étant rempli par ladite solution A et/ou par une autre solution.

10

2. Procédé de transport d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

- on prépare à partir de l'échantillon, dans un premier contenant relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant, une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques,

- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement,

20

le deuxième contenant étant rempli par la solution A et/ou par une autre solution.

3. Procédé de transport d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

25

- on prépare à partir de l'échantillon une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques,

- on introduit la solution A dans un premier contenant relié via à un goulet d'étranglement à un deuxième contenant, et

30

- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement,
- 5 le deuxième contenant étant rempli par la solution A et/ou par une autre solution.

4. Procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

- 10 - on prépare à partir de l'échantillon, dans un premier contenant de volume α relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant de volume β , le volume β étant plus petit que le volume α , une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules
- 15 magnétiques, et

- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement,
- 20 le deuxième contenant étant rempli par la solution A et/ou par une autre solution.

5. Procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

- 25 - on prépare à partir de l'échantillon une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques,

- on introduit la solution A dans un premier contenant de volume α relié via un goulet
- 30 d'étranglement à un deuxième contenant de volume β , le volume β étant plus petit que le volume α , et

- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement,
- 5 le deuxième contenant étant rempli par la solution A et/ou par une autre solution.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel on libère l'analyte
10 fixé sur les particules magnétiques desdites particules dans le deuxième contenant.

7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel on déplace au moyen d'un système magnétique les
15 particules magnétiques libérées de l'analyte hors du deuxième contenant.

8. Procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

- 20 - on prépare à partir de l'échantillon, dans un premier contenant de volume α relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant de volume β , le volume β étant plus petit que le volume α , une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules
25 magnétiques,

- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant jusqu'au goulet d'étranglement,

- on libère l'analyte fixé sur les particules
30 magnétiques desdites particules au niveau du goulet d'étranglement, et

- on transporte par déplacement de liquide l'analyte du goulet d'étranglement vers le deuxième contenant, les particules magnétiques étant maintenues au niveau dudit goulet d'étranglement.

5

9. Procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

- on prépare à partir de l'échantillon une solution A, dans laquelle l'analyte est fixé sur des
10 particules magnétiques,

- on introduit la solution A dans un premier contenant de volume α relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant de volume β , le volume β étant plus petit que le volume α ,

15 - on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant jusqu'au goulet d'étranglement,

- on libère l'analyte fixé sur les particules magnétiques desdites particules au niveau du goulet
20 d'étranglement, et

- on transporte par déplacement de liquide l'analyte du goulet d'étranglement vers le deuxième contenant, les particules magnétiques étant maintenues au niveau dudit goulet d'étranglement.

25

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, dans lequel on déplace au moyen d'un système magnétique les particules magnétiques libérées de l'analyte du deuxième contenant au premier
30 contenant via le goulet d'étranglement, ou du goulet d'étranglement audit premier contenant.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, dans lequel l'analyte est libéré des particules magnétiques par modification des conditions physiques ou chimiques par exemple par chauffage ou par réaction avec au moins une substance présente dans l'autre solution.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel un agent d'immobilisation de l'analyte est fixé sur tout ou partie d'au moins une paroi du deuxième contenant ou de tout support solide présent dans ledit deuxième contenant.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel le goulet d'étranglement est sous la forme d'un capillaire.

14. Procédé de mise en évidence d'un analyte dans un échantillon dans lequel :

- on procède à une concentration de l'analyte au moyen d'un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, et
- on met en évidence l'analyte dans le deuxième contenant ou dans tout autre contenant relié directement ou indirectement au deuxième contenant.

15. Procédé selon la revendication 14, dans lequel l'analyte est choisi parmi un microorganisme tel qu'une bactérie, un champignon, un virus, un composé chimique, une molécule telle qu'un peptide, une protéine, un enzyme, un polysaccharide, un lipide, une

lipoprotéine, un lipopolysaccharide, un acide nucléique, une hormone, un antigène, un anticorps, un facteur de croissance, une cellule tumorale.

5 16. Procédé selon la revendication 14 ou 15, dans lequel l'analyte étant un acide nucléique, il est mis en évidence par une technologie de puce à acide nucléique, préférentiellement à ADN.

10 17. Dispositif de transport d'un analyte fixé sur des particules magnétiques présent dans un liquide, ledit dispositif comprenant :

- un premier contenant (3) destiné à contenir un liquide et relié via un goulet d'étranglement (5) à
15 un deuxième contenant (7), et

- un système magnétique permettant de déplacer les particules magnétiques sur lesquelles est fixé l'analyte du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement.

20

18. Dispositif de concentration d'un analyte fixé sur des particules magnétiques présent dans un liquide, ledit dispositif comprenant :

- un premier contenant (3) de volume α destiné
25 à contenir un liquide relié via un goulet d'étranglement (5) à un deuxième contenant (7),

- ledit deuxième contenant de volume β plus petit que le volume α du premier contenant, et

- un système magnétique permettant de déplacer
30 les particules magnétiques sur lesquelles est fixé l'analyte du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement.

19. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18, dans lequel le premier contenant et/ou le deuxième contenant ont une forme qui
5 converge vers le goulet d'étranglement.

20. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, comprenant un évent sous forme de capillaire présent au niveau du deuxième contenant.
10

21. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 17 à 18, dans lequel le système magnétique est constitué d'au moins un aimant externe et/ou une bobine et/ou une bobine intégrée réalisée par
15 un procédé de micro-technologie.

22. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 17 à 21, dans lequel le deuxième contenant et/ou le goulet d'étranglement est/sont
20 muni(s) de canaux d'entrée-sortie de fluides.

23. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 17 à 22, dans lequel le goulet d'étranglement a une section comprise entre $1 \mu\text{m}^2$ à
25 1 mm^2 , préférentiellement entre $100 \mu\text{m}^2$ et $0,1 \text{ mm}^2$.

24. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 17 à 23, dans lequel le rapport des volumes α/β est de 10 à 1000.
30

25. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 17 à 24, dans lequel le premier contenant a un volume d'environ 0,1 à 100 μ l.

- 5 26. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 17 à 25, dans lequel le deuxième contenant a un volume d'environ 0,01 à 1 μ l.

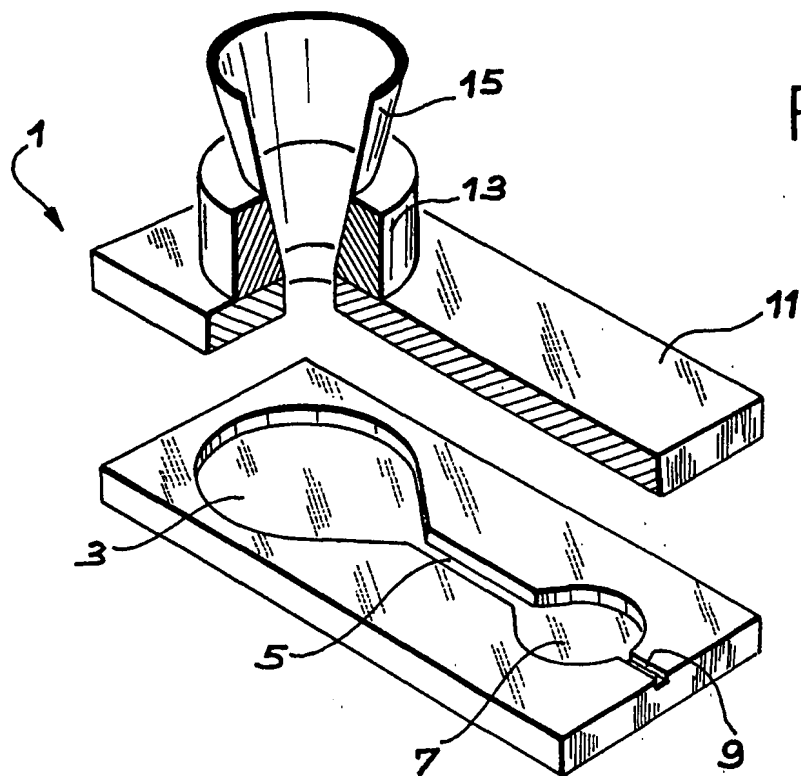


FIG. 1

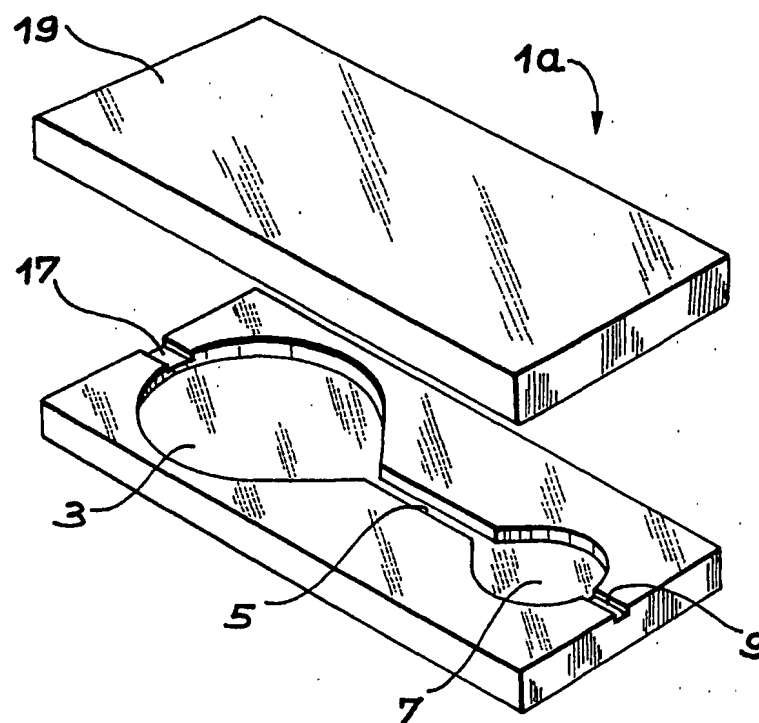


FIG. 2

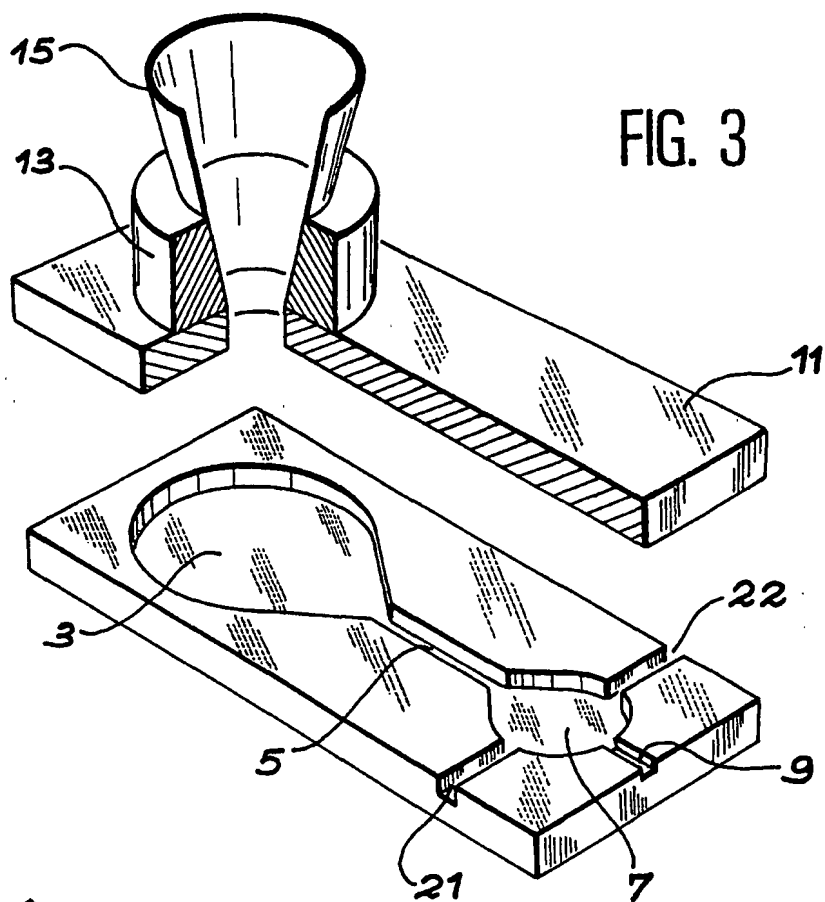


FIG. 3

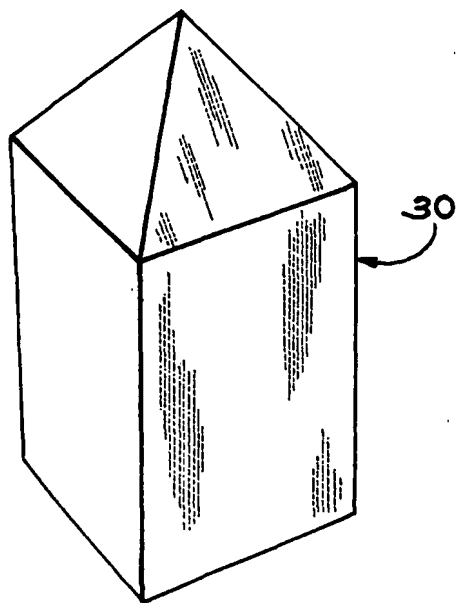


FIG. 4

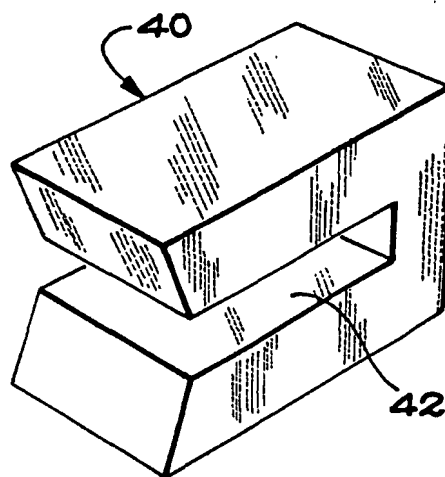


FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/03743

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 50172 A (CHOW ANDREA W ;BOUSSE LUC J (US); GALLAGHER STEVE (US); KNAPP MICH) 31 August 2000 (2000-08-31) page 7, line 32 - line 33 page 15, line 31 -page 16, line 4 page 20, line 4 - line 29; figure 1B page 24, line 2 - line 3; figure 1B page 77, line 5 - line 19 page 88, line 28 - line 31 claims 1,21,22,37,53,54 ---	1-26
Y	US 6 074 827 A (SASSI ALEXANDER P ET AL) 13 June 2000 (2000-06-13) column 4, line 54 -column 5, line 3 column 5, line 65 -column 6, line 17 column 6, line 43 - line 45 column 6, line 62 - line 64 --- -/--	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 March 2002

Date of mailing of the international search report

05/04/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hocquet, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No
PCT/FR 01/03743

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 863 502 A (SOUTHGATE PETER DAVID ET AL) 26 January 1999 (1999-01-26) column 25, line 26 -column 26, line 36 column 28, line 61 -column 29, line 7 ----	1-26
A	WO 98 10267 A (BLANKENSTEIN GERT ;TECHNICAL UNIVERSITY OF DENMAR (DK)) 12 March 1998 (1998-03-12) page 9, line 32 - line 33 page 10, line 30 - line 39 page 22, line 16 - line 32 ----	1-26
X	US 5 498 392 A (WILDING PETER ET AL) 12 March 1996 (1996-03-12) column 5, line 26 - line 39 ----	1
X	WO 94 26414 A (SYNTEX INC) 24 November 1994 (1994-11-24) page 17, line 44 -page 18, line 35; figure 6 -----	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/03743

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0050172	A	31-08-2000	AU 3372800 A	14-09-2000
			AU 3498900 A	14-09-2000
			EP 1163052 A1	19-12-2001
			EP 1163369 A1	19-12-2001
			WO 0050642 A1	31-08-2000
			WO 0050172 A1	31-08-2000
US 6074827	A	13-06-2000	US 6007690 A	28-12-1999
			US 5770029 A	23-06-1998
			AU 2488799 A	23-08-1999
			CA 2320362 A1	12-08-1999
			EP 1053298 A1	22-11-2000
			JP 2002502597 T	29-01-2002
			WO 9940174 A1	12-08-1999
			US 6344326 B1	05-02-2002
			AU 744264 B2	21-02-2002
			AU 3968097 A	20-02-1998
			EP 1007953 A1	14-06-2000
			JP 2000515978 T	28-11-2000
			WO 9804909 A1	05-02-1998
			US 6176962 B1	23-01-2001
US 5863502	A	26-01-1999	AU 1825197 A	20-08-1997
			WO 9727324 A1	31-07-1997
WO 9810267	A	12-03-1998	AT 211258 T	15-01-2002
			AU 4113297 A	26-03-1998
			DE 69709377 D1	31-01-2002
			WO 9810267 A1	12-03-1998
			EP 0925494 A1	30-06-1999
			JP 2002503334 T	29-01-2002
			NO 991051 A	27-04-1999
US 5498392	A	12-03-1996	US 6184029 B1	06-02-2001
			US 5726026 A	10-03-1998
			US 5587128 A	24-12-1996
			US 5955029 A	21-09-1999
			US 5928880 A	27-07-1999
			AT 155711 T	15-08-1997
			AT 167816 T	15-07-1998
			AT 140025 T	15-07-1996
			AT 140880 T	15-08-1996
			AT 174813 T	15-01-1999
			AU 677780 B2	08-05-1997
			AU 4222393 A	29-11-1993
			AU 680195 B2	24-07-1997
			AU 4222593 A	29-11-1993
			AU 677781 B2	08-05-1997
			AU 4222693 A	29-11-1993
			AU 4222793 A	29-11-1993
			AU 677197 B2	17-04-1997
			AU 4223593 A	29-11-1993
			CA 2134474 A1	11-11-1993
			CA 2134475 A1	11-11-1993
			CA 2134476 A1	11-11-1993
			CA 2134477 A1	11-11-1993
			CA 2134478 A1	11-11-1993
			DE 69303483 D1	08-08-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/03743

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5498392	A		DE 69303483 T2	06-02-1997
			DE 69303898 D1	05-09-1996
			DE 69303898 T2	20-02-1997
			DE 69312483 D1	04-09-1997
			DE 69312483 T2	12-02-1998
			DE 69319427 D1	06-08-1998
			DE 69319427 T2	10-12-1998
			DE 69322774 D1	04-02-1999
			DE 69322774 T2	17-06-1999
			EP 0637996 A1	15-02-1995
			EP 0637997 A1	15-02-1995
			EP 0639223 A1	22-02-1995
			EP 0637998 A1	15-02-1995
			EP 0637999 A1	15-02-1995
			ES 2106341 T3	01-11-1997
			ES 2127276 T3	16-04-1999
			GR 3025037 T3	30-01-1998
			GR 3029509 T3	28-05-1999
			HK 16897 A	13-02-1997
			JP 7506430 T	13-07-1995
			JP 7506431 T	13-07-1995
			JP 7506256 T	13-07-1995
			JP 3207424 B2	10-09-2001
			JP 7506257 T	13-07-1995
			JP 7506258 T	13-07-1995
WO 9426414	A	24-11-1994	WO 9426414 A1	24-11-1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No

PCT/FR 01/03743

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 B01L3/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 B01L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 00 50172 A (CHOW ANDREA W ;BOUSSE LUC J (US); GALLAGHER STEVE (US); KNAPP MICH) 31 août 2000 (2000-08-31) page 7, ligne 32 - ligne 33 page 15, ligne 31 -page 16, ligne 4 page 20, ligne 4 - ligne 29; figure 1B page 24, ligne 2 - ligne 3; figure 1B page 77, ligne 5 - ligne 19 page 88, ligne 28 - ligne 31 revendications 1,21,22,37,53,54 ---	1-26
Y	US 6 074 827 A (SASSI ALEXANDER P ET AL) 13 juin 2000 (2000-06-13) colonne 4, ligne 54 -colonne 5, ligne 3 colonne 5, ligne 65 -colonne 6, ligne 17 colonne 6, ligne 43 - ligne 45 colonne 6, ligne 62 - ligne 64 --- -/-	1-26

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 mars 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/04/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hocquet, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 01/03743

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 863 502 A (SOUTHGATE PETER DAVID ET AL) 26 janvier 1999 (1999-01-26) colonne 25, ligne 26 - colonne 26, ligne 36 colonne 28, ligne 61 - colonne 29, ligne 7 ----	1-26
A	WO 98 10267 A (BLANKENSTEIN GERT ; TECHNICAL UNIVERSITY OF DENMARK (DK)) 12 mars 1998 (1998-03-12) page 9, ligne 32 - ligne 33 page 10, ligne 30 - ligne 39 page 22, ligne 16 - ligne 32 ----	1-26
X	US 5 498 392 A (WILDING PETER ET AL) 12 mars 1996 (1996-03-12) colonne 5, ligne 26 - ligne 39 ----	1
X	WO 94 26414 A (SYNTEX INC) 24 novembre 1994 (1994-11-24) page 17, ligne 44 - page 18, ligne 35; figure 6 -----	1-5